カンキツグリーニング病診断キット

Candidatus Liberibacter Detection Kit

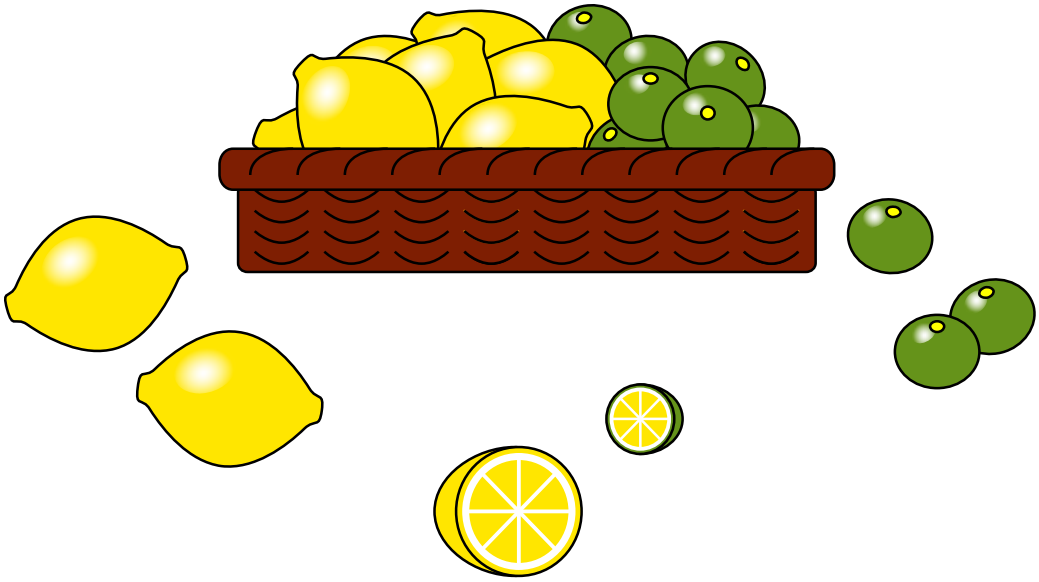
取扱説明書

version 7.0.0

製品コード

NE0031

NE0033



ニッポン・ジーン

カンキツグリーニング病診断キット
取扱説明書 version 7.0.0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**カンキツグリーニング病診断キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてカンキツグリーニング病の病原細菌様微生物を検出することによりカンキツグリーニング病の検査を行うための試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】（2 ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

3. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. カンキツ樹木あるいは苗木の感染部位や感染レベルによっては本キットを使用しても検出されない場合がありますので、病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は同一個体の数箇所から葉を採取して定期的に検査を実施してください。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび **HLB 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

7. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン； http://nippongene-analysis.com/

8. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

9. LAMP法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP法を用いたカンキツグリーニング病の病原細菌様微生物検出用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

10. **カンキツグリーニング病診断キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
    株式会社富士通システムズ・イースト
    e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）； http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

1. キット説明……1

カンキツグリーニング病診断キットの概要
カンキツグリーニング病とその診断
LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して

2. キット内容……2

キット内容と保存温度

3. 必要な器具、機器、および試薬……3

4. キット使用方法……5

簡易プロトコル……5
検査を行う前の準備および注意事項……7
サンプルの準備
器具、機器の準備
検査環境
詳細な使用方法……10
DNAの抽出
検査反応
判定

5. トラブルシューティング……16

6. 文献・資料……17

7. 付録……18

品質管理
HLB 陽性コントロールのコピー数
メモ

本キットに含まれているLAMPプライマーセットおよびこのLAMPプライマーセットを用いたLAMP法によるカンキツグリーニング病の検査技術は、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「難防除病害カンキツグリーニング病の拡大阻止技術の開発」において、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センターによって開発されました。

1. キット説明

【カンキツグリーニング病診断キットの概要】

本キットはLAMP法を利用してカンキツグリーニング病の病原細菌様微生物 *Candidatus* Liberibacter asiaticus（*Ca.* L. asiaticus）を検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便なDNA増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP法により *Ca.* L. asiaticus ゲノム DNA の一部を増幅し、増幅の有無から *Ca.* L. asiaticus の存在を判定します。

検出に必要な操作は、キットに添付されている**HLB抽出液**を用いて検体から抽出したDNAを検査溶液（**HLB検査液**、**HLB酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に加えて65℃に60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。検体中に*Ca.* L. asiaticusが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによって*Ca.* L. asiaticusゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体中に*Ca.* L. asiaticusが存在しない場合には、DNAの増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間で*Ca.* L. asiaticusゲノムDNAを検出することが可能です。

【カンキツグリーニング病とその診断】

カンキツグリーニング病（Citrus greening disease; Citrus Huanglongbing; HLB）はカンキツ葉の篩部に局在する細菌様微生物 *Candidatus* Liberibacter subspieces によって引き起こされるアジア、アフリカ、アメリカの熱帯、亜熱帯地域におけるカンキツ類の重要病害であり、罹病樹では葉の黄化、落葉、果実の着色不良等の病徴が現れ、最終的に枯死に至ります。カンキツグリーニング病は接木の他ミカンキジラミ（*Diaphorina citri*）の媒介による拡大が深刻化しており、日本においても植物防疫上の重要侵入病害として警戒されていましたが、昭和 63 年に沖縄県西表島で初めて侵入が確認されました。

有効な抵抗性品種および治療方法が開発されていないカンキツグリーニング病はきわめて深刻な病害とされ、日本の他、アメリカ、ブラジル、アフリカ、東南アジアにおいても農業生産上大きな問題とされています。また植物防疫法では、沖縄県、鹿児島県の指定区域からのカンキツ類の苗木の持ち出しが禁止されています。

罹病樹から健全樹への感染拡大を防止するためには罹病樹の早期発見、除去が不可欠となりますが、カンキツグリーニング病の病徴は要素欠乏症と類似しており、目視観察による判定が困難とされています。*Ca.* L. asiaticus の人工培地による培養が現時点で確立されておらず、有効な血清や抗体が存在しないため、PCR法やLAMP法による核酸増幅検査が行われています。

【LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

カンキツグリーニング病診断キット

48 テスト用（製品コード: NE0031）
192 テスト用（製品コード: NE0033）

試薬名 （チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量		保存温度
		48 テスト用	192 テスト用	
取扱説明書	−	1 部	1 部	室温
検査用チューブ	−	48 本	48 本 x 4 袋	室温
HLB 検査液	赤色	1,050 µl	1,050 µl x 4 本	−20℃（遮光）
HLB 酵素液	黄色	50 µl	50 µl x 4 本	−20℃（遮光）
蛍光発色液	紫色	50 µl	50 µl x 4 本	−20℃（遮光）
HLB 陽性コントロール	灰色	50 µl	50 µl x 4 本	−20℃（遮光）
ミネラルオイル	青色	1,000 µl	1,000 µl x 4 本	−20℃（遮光）
HLB 抽出液	橙色	6,000 µl x 2 本	6,000 µl x 8 本	−20℃（遮光）
HLB 中和液	緑色	1,200 µl x 2 本	1,200 µl x 8 本	−20℃（遮光）
核酸フリー水	青色	1,000 µl	1,000 µl x 4 本	−20℃（遮光）

取り扱い上の注意

- 本キットでは、48 テスト分あるいは 192 テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、48 テスト分あるいは 192 テスト分の検査反応を行うことが可能です。48 テスト分あるいは 192 テスト分以下の検査反応を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。

- **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。

- **取扱説明書**、**検査用チューブ**、**HLB 抽出液**、および **HLB 中和液**以外の試薬は−20℃で遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。

- 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20℃で保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。

- **HLB 酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。

- **HLB 陽性コントロール**は、*Ca.* L. asiaticus ゲノムDNAに特徴的な配列を含むDNA溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。

- 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

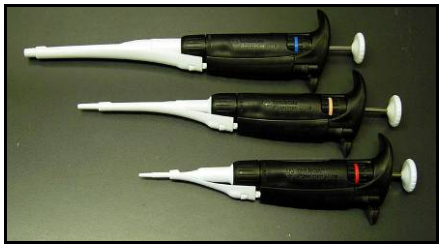
- **HLB 抽出液**（水酸化ナトリウム含有）および **HLB 中和液**（酢酸含有）の取り扱いには十分に注意してください。皮膚や粘膜に触れた場合は大量の水道水で洗い流し、製品安全データシート（MSDS）を参照の上、適切な処置を施してください。

- **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号）」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

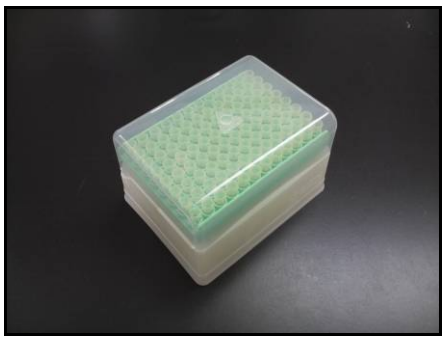
3. 必要な器具、機器、および試薬

【必ずご準備頂く器具、機器】

- マイクロピペット
  (0.5–10 µl、10–100 µl、200–1,000 µl)



- フィルター付マイクロチップ（滅菌済)*



- マイクロチューブ
  (1.5 ml あるいは 2.0 ml)

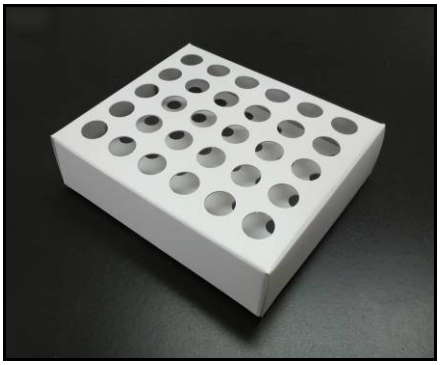
- 使い捨て手袋

- 6 mm パンチ（検体採取用）
- イソプロパノール
- 80%エタノール
- インキュベーター（恒温器）
  ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、95˚C、65˚C、80˚C それぞれの温度を保持する機器が必要です。

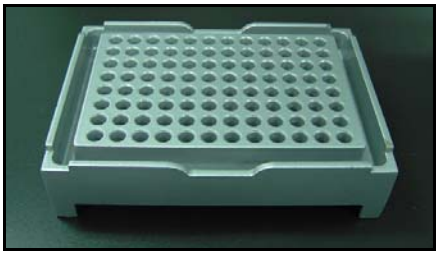
【その他の器具、機器、および試薬】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック*



- アルミラックあるいはプレートラック



● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。240–260 nm あるいは 350–370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

● フロートプレート*
ウォーターバスで保温する際に使用します。

● ピンセット

● 氷（クラッシュアイス）

● サンプル採取用ビニールパック

● 100 mM Tris–HCl (pH 8.0)

● ペーパータオル

● 爪楊枝

● Proteinase K

● 高速遠心機

＊マイクロピペット、ピペットチップ、マイクロチューブなど、LAMP 法を用いた遺伝子検査を行うために必要な器具・消耗品類をまとめた**遺伝子ツールボックス**（製品コード： NE4111）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

4. キット使用方法

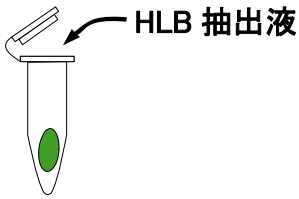
【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

1. カンキツ葉中肋部位をパンチ等で打ち抜く

2. 葉片を 1.5 ml チューブに入れ、HLB 抽出液 250 µl を添加する



3. 95˚C で 5 分間保温する

4. 水相を新しいチューブに移し、HLB 中和液 50.0 µl を添加する

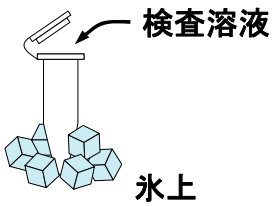
5. イソプロパノール 300 µl を添加して十分に混合する

6. 15,000 rpm、15 分間、4˚C にて遠心する

7. 沈殿を 80%エタノールで洗浄し、風乾する

8. 核酸フリー水 50.0 µl に溶解する

9. 検査溶液を必要量まとめて作製する

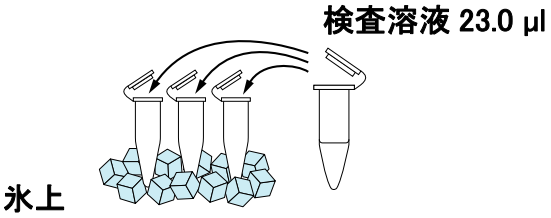


試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
HLB 検査液	21.0 µl	189.0 µl	525.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
HLB 酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査溶液合計	23.0 µl	207.0 µl	575.0 µl

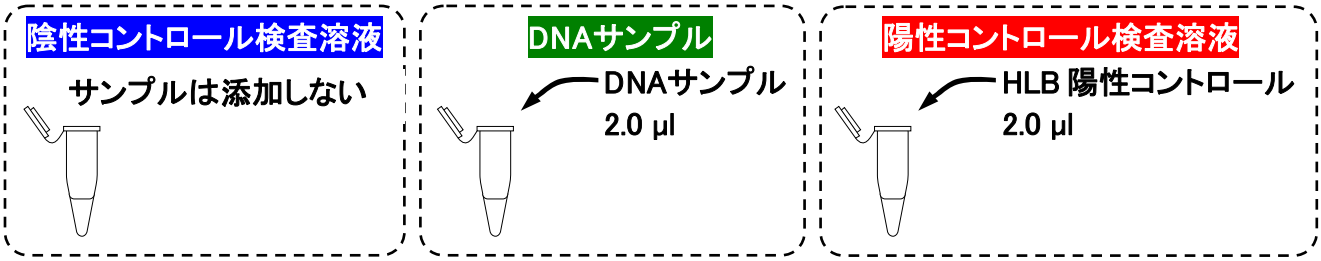
＊　分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

簡易プロトコル

10. 検査溶液を 1 テストあたり 23.0 µl ずつ分注する



11. サンプル 2.0 µl を添加する



＊ HLB 陽性コントロールは必ず最後に添加する。

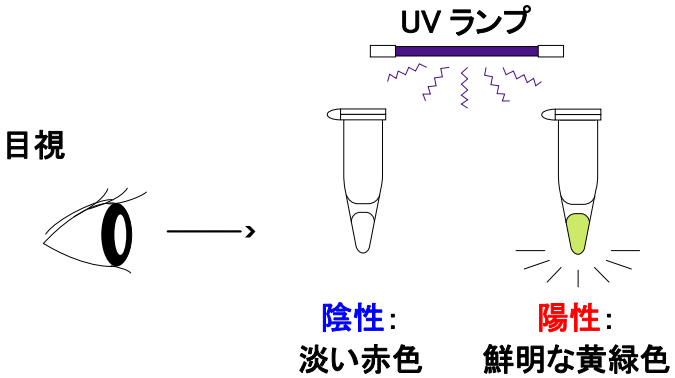
12. ミネラルオイル 20.0 µl を重層する（必要時のみ）

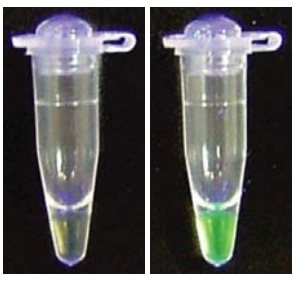
＊ 最初に核酸蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますので、必要な場合は本キットに添付のミネラルオイルを 20.0 µl 程度重層してください。

13. 65°C、60 分間（検査反応）

14. 80°C、2 分間（検査反応停止）

15. 判定





【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■　コントロール

本キットには、検査の成否を確認するための **HLB 陽性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、**HLB 陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および**核酸フリー水**を添加する「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■　DNA サンプルの準備

検査にはカンキツあるいはミカンキジラミから抽出したDNAを使用します。本キットは、カンキツ葉検体（中肋部位）から DNA の簡易抽出を行うための試薬（**HLB 抽出液**、**HLB 中和液**）および簡易抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前にDNAを準備してください。

重要

凍結したカンキツ葉検体から抽出を行った場合は多糖の混入が増加し、以降の DNA 増幅反応が阻害される場合があります。

＜カンキツ葉検体からの DNA 抽出＞

市販の植物 DNA 抽出キットあるいは CTAB 法を用いて DNA の抽出を行う場合にも、中肋部位を含むカンキツ葉片を DNA 抽出用検体として準備してください。

Nucleon PhytoPure（GE ヘルスケアバイオサイエンス株式会社）、DNeasy Plant Mini Kit（株式会社キアゲン）、あるいはそれに準ずるキットの使用が可能ですが、DNA サンプルの濃度は 5 ng/µl 以下にならないようにしてください。また、1 mM を超える EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物を含むと、誤判定の原因となります。本キットでは、最適な溶媒としてキットに添付の**核酸フリー水**あるいは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を推奨しています。

器具、機器の準備

■ インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■ 器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に **HLB 陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび **HLB 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■ 作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では **HLB 陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。

検査溶液へのサンプルおよび **HLB 陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

＜方法＞

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv) 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v) 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

【詳細な使用方法】

DNA の抽出

本キットは、カンキツ葉検体（中肋部位）から DNA の簡易抽出を行うための試薬（**HLB 抽出液**、**HLB 中和液**）および簡易抽出プロトコルを備えています。市販の植物 DNA 抽出キット或いは CTAB 法を用いて抽出、精製した DNA サンプルが既に存在する場合は、**検査反応**からお読みください。

＜I. カンキツ葉検体からの DNA 抽出＞

I-a. DNA 抽出

パンチ等で 6 mm 程度の大きさに打ち抜いたカンキツ葉検体（中肋部位）の葉片を 1.5 ml チューブに入れ、**HLB 抽出液** 250 µl を添加し、葉片が完全に浸るよう軽く振とうしてから、95°C のインキュベーターあるいは沸騰水中で 5 分間保温します。エアーインキュベーターを使用する場合、ドア開閉時に温度が低下しますので、10 分間保温してください。

同一あるいは異なる葉から採取した葉片を最大 5 枚まで同一チューブ中で処理できます。

重要

サンプルは磨砕しないでください。なお、**HLB 抽出液**には水酸化ナトリウムが含まれていますので、取り扱いには十分に注意してください。皮膚や粘膜に触れた場合は大量の水道水で洗い流し、適切な処置を施してください。

I-b. 中和

簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、新しい 1.5 ml チューブに水相を移して **HLB 中和液** 50.0 µl を添加します。

I-c. 精製

イソプロパノール 300 µl を添加して十分に混和した後、15,000 rpm、15 分間、4°C にて遠心し、上清を除去します。沈殿を 80%エタノール洗浄して風乾した後、**核酸フリー水**あるいは 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 50.0 µl に溶解し、DNA サンプルとします。

＜II. ミカンキジラミからの DNA 抽出＞

II-a. DNA 抽出

ミカンキジラミを入れた 1.5 ml チューブに 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、25 mM NaCl、5% Proteinase K を含む緩衝液 100 µl を添加し、滅菌した爪楊枝等を用いて磨砕します。

重要

サンプルは磨砕しないでください。なお、**HLB 抽出液**には水酸化ナトリウムが含まれていますので、取り扱いには十分に注意してください。皮膚や粘膜に触れた場合は大量の水道水で洗い流し、適切な処置を施してください。

II-b. 熱処理

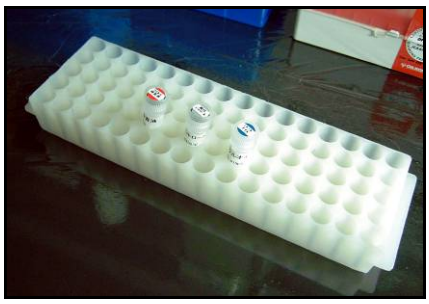
55°C のインキュベーターで 60 分間保温した後、94°C で 15 分間の熱処理を行います。

II-c. 精製

上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、DNA サンプルとします。

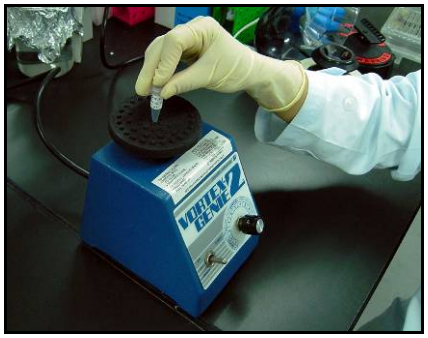
検査反応

試薬の融解



HLB 検査液、核酸フリー水、HLB 陽性コントロール、ミネラルオイルを取り出し、室温で完全に融解します。**HLB 酵素液**および**蛍光発色液**は−20℃では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン



チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製

検査溶液調製用チューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

試薬	1 テスト	8+1 テスト*
HLB 検査液	21.0 µl	189.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl
HLB 酵素液	1.0 µl	9.0 µl
検査溶液合計	23.0 µl	207.0 µl

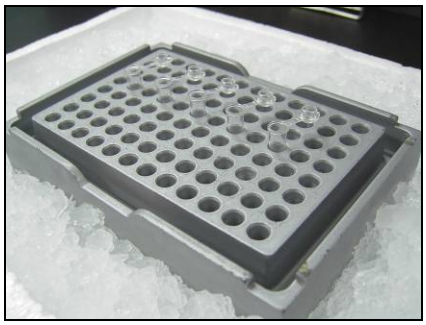
＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

重要

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回ごとに使い捨てとして使用してください。

HLB 酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンダウンを行ってください。

検査溶液の分注



核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を 23.0 µl ずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

DNAサンプルの添加

DNAサンプル 2.0 µl を検査溶液に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付の**ミネラルオイル**を 20.0 µl 程度重層し、キャップを閉じます（蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますのでご注意ください）。なお、インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラーを使用する場合には、ミネラルオイルの添加は不要です。

コントロールを作製する場合は、

i) DNA サンプル添加の前に陰性コントロール検査溶液のチューブに**核酸フリー水** 2.0 µl を添加し、20.0 µl の**ミネラルオイル**を分注してキャップを閉じます。
ii) DNA サンプルを添加し、各チューブに**ミネラルオイル**を 20.0 µl ずつ分注してキャップを閉じます。
iii) 最後に、陽性コントロール検査溶液のチューブに **HLB 陽性コントロール**を 2.0 µl 添加し、**ミネラルオイル**を 20.0 µl 分注してキャップを閉じます。

重要

市販の植物 DNA 抽出キットあるいは CTAB 法を用いて抽出、精製した DNA サンプルを用いる場合、DNA サンプルの濃度は 5 ng/µl 以下にならないようにしてください。

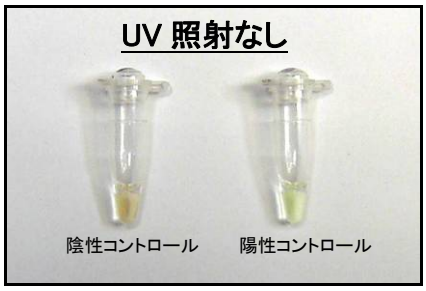
検査反応

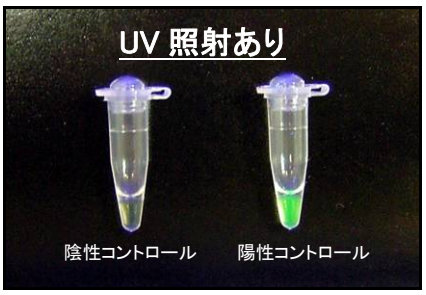
全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーターなどを用いて 65°C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、**検査用チューブ**が反応中に傾かないようにしてください。

判定

検査の成否の判定





60分間保温した後、80°Cで 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は60分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

DNA サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、DNA サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、検体中に *Ca*. L. asiaticus が存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められる検体

「*Ca*. L. asiaticus **陽性** ＝ **カンキツグリーニング病陽性**」と判定します。
仮に蛍光の発色が微弱である場合でも、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められた検体に関しては再度検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められない検体

「*Ca*. L. asiaticus **陰性** ＝ **カンキツグリーニング病陰性**」と判定します。
カンキツ樹木あるいは苗木の感染部位や感染レベルによっては本キットを使用しても検出されない場合がありますので、病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は同一個体の数箇所から葉を採取して定期的に検査を実施してください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. HLB 陽性コントロールの添加量が過剰である。** HLB **陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。HLB **陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240–260 nm あるいは 350–370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。

6. 文献・資料

1. 岩波 徹、奥田 充 (2006) カンキツグリーニング病の高精度検定法の開発 植物防疫 **60** (7), 18

2. 大石 毅、豊里 哲也、諸見里 知絵、玉城 秀和、上間 君子、谷口 昌弘、河村 太 (2006) 沖縄県におけるカンキツグリーニング病保毒虫発生の現状と分布状況 九州病害虫研究会報 **52**, 66

3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12), e63

4. Okuda, M., Matsumoto, M., Tanaka, Y., Subandiyah, S., Iwanami, T. (2005) Characterization of the *tuf*B-*sec*E-*nus*G-*rpl*KAJL-*rpo*B gene cluster of the citrus greening organism and detection by Loop-mediated isothermal amplification. *Plant Disease*. **89**: 705

5. 奥田 充、河野 伸二、村山 裕子、岩波 徹 (2008) LAMP 法を用いたカンキツグリーニング病原細菌検出の反応条件と非磨砕 DNA 抽出法の検討 植物病理学会報 **74**, 316

6. 奥田 充、河野 伸二、澤岨 哲也、岩波 徹 (2009) 低濃度に感染した野外試料から *Candidatus* Liberibacter asiaticus を検出する場合における遺伝子増幅法による陽性率の違い 九州病害虫研究会報 **55**, 62

7. 奥田 充 (2005) 病原体ゲノム解析と高感度遺伝子診断法の開発 九州農業研究発表会シンポジウム「難防除病害カンキツグリーニング病の拡大阻止技術開発の現状」講演資料集 5

8. 奥田 充 (2006) LAMP 法を利用したカンキツグリーニング病の迅速診断 第 11 回 e-Loopamp セミナー

9. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques*. **12** (3):358

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の **HLB 陽性コントロール** 2.0 µl を鋳型 DNA として 25.0 µl（1 テスト分）の容量でDNA増幅反応を行い、65°C、60 分間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

キットに添付の**核酸フリー水** 2.0 µl を鋳型 DNA として 25.0 µl（1 テスト分）の容量でDNA増幅反応を行い、65°C、60 分間で**蛍光発色液**が発色しないことを確認しています。

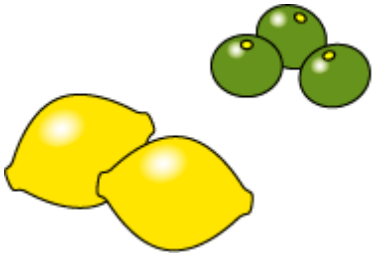
【HLB 陽性コントロールのコピー数】

HLB 陽性コントロールには、2.0 µl あたりおよそ $1x\ 10^5$ コピーの標的配列が含まれています。

【メモ】

【メモ】

ニッポン・ジーン



- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2015 年 5 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-6712-3885
FAX	03-6712-3886
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp

Copyright © 2015 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.